桔小实蝇气味结合蛋白 BdorOBP2 的 cDNA 克隆、组织表达及配基结合特性

陈 玲,李红亮,周宇翔,赵 磊,张林雅,倪翠侠,商晗武*
(中国计量学院生命科学学院,浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室,杭州 310018)

摘要:为了研究桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 气味结合蛋白(odorant-binding proteins, OBPs)参与其嗅觉识别过程中的功能及其与植物气味的结合特性,本研究克隆了桔小实蝇的一个气味结合蛋白基因,命名为 *BdorOBP*2(GenBank 登录号为 KC773766),并对该基因进行了原核表达。*BdorOBP*2 开放阅读框长 447 bp,编码 148 个氨基酸,具有典型的 6 个半胱氨酸位点。定量 PCR 结果显示,桔小实蝇 *BdorOBP*2 在不同组织中均有表达,其中头部中的表达量最高,翅中表达量最低(为头部表达量的 63% ±6%)。构建了 *BdorOBP*2 原核表达载体,诱导并获得了重组 BdorOBP2 并进行了亲和层析纯化。最后以 N-苯基-1-萘胺(N-phenyl-1-naphthylamine, 1-NPN)为荧光探针,利用荧光竞争结合实验测定了重组 BdorOBP2 与 7 种主要寄主水果气味物质的结合能力,发现其对多数酯类和醛类化合物亲合力较强,亲合力最强的气味物质为反-2-己烯醛和 β-紫罗兰酮,结合常数 K_D 分别为 9.96 和 15.37 μmol/L。本研究结果可为高效地开发和设计桔小实蝇的嗅觉引诱剂配方提供一定的理论依据和参考。

关键词:桔小实蝇;气味结合蛋白;组织表达谱;原核表达;荧光竞争结合实验
中图分类号:Q966 **文献标识码**:A **文章编号**:0454-6296(2013)06-0612-10

cDNA cloning, tissue expression and ligand binding characteristics of odorant-binding protein 2 from the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae)

CHEN Ling, LI Hong-Liang, ZHOU Yu-Xiang, ZHAO Lei, ZHANG Lin-Ya, NI Cui-Xia, SHANG Han-Wu* (Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: In order to study the function and binding characteristics of the odorant-binding proteins (OBPs) in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, we cloned an OBP cDNA from *B. dorsalis*, which was named *BdorOBP*2 (GenBank accession no.: KC773766), and then heterologously expressed its protein in prokaryotic cells. *BdorOBP*2 contains a 447-bp open reading frame (ORF) encoding 148-amino-acid residues. The mature protein of BdorOBP2 includes six conserved cysteine residues, which are the hallmark of insect OBPs. Real-time quantitative PCR results showed that *BdorOBP*2 was expressed in different tissues with the highest expression in the head and the lowest in the wings (63% ± 6% of the expression level in the head). The recombinant protein BdorOBP2 was purified by affinity chromatography, and N-phenyl-1-naphthylamine (1-NPN) was applied as a fluorescent probe to measure the binding capacity of BdorOBP2 with each of seven major host fruit odors. The results indicated that BdorOBP2 can evidently bind to most esters and aldehydes examined. BdorOBP2 showed the highest affinity to *trans*-2-hexenal and β-ionone with the dissociation constant K_D of 9.96 and 15.37 μmol/L, respectively. The results of this study may help rational designs of specific and effective attractants to be used for managing *B. dorsalis*.

Key words: *Bactrocera dorsalis*; odorant-binding protein (OBP); tissue expression pattern; prokaryotic expression; fluorescence competitive binding assay

基金项目:浙江省植物有害生物防控重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地开放基金(2010DS700124-KF1209);农业部农药残留检测重点实验室开放基金(2012PRG02);浙江省重大农业科研专项(2006C12020);浙江省重点科技创新团队项目(2010R50028)
作者简介:陈玲,女,1987 年 9 月生,陕西宝鸡人,硕士研究生,研究方向为外来生物预防控制技术,E-mail: chenling52194@163.com
*通讯作者 Corresponding author, E-mail: hwshang@cjlu.edu.cn
收稿日期 Received: 2013-03-01; 接受日期 Accepted: 2013-04-29

昆虫的嗅觉系统是一种高度专一、极其灵敏的化学检测器，可以识别环境中的特异性化学气味分子，在昆虫觅食、寻偶、选择产卵场所等信息交换过程中承担着重要角色(Gotzek *et al.*, 2011)。昆虫触角是其嗅觉系统的重要器官，而气味结合蛋白(odorant-binding proteins, OBPs)则是广泛分布于昆虫触角感器淋巴液中的一种低分子量的水溶性蛋白，其生理功能一般解释为能溶解并运输外界脂溶性分子，穿过触角感器淋巴液到达嗅觉神经元树突膜上的气味受体，从而激活信号转导过程(Vogt *et al.*, 1991; Kim and Smith, 2001)。昆虫 OBPs 分子量一般为 15～20 kD，由 120～150 个氨基酸组成，其典型特征是在其二级序列中存在 6 个保守的半胱氨酸(Cys)残基以形成 3 对二硫键(Pelosi *et al.*, 2006)，目前已在多种昆虫中发现，例如双翅目的果蝇属 *Drosophila* (Yasukawa *et al.*, 2010)，直翅目的飞蝗 *Locusta migratoria* (Ban *et al.*, 2003a)、膜翅目的中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* (李红亮等，2008，2013)以及鳞翅目的棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Zhang *et al.*, 2011)等。昆虫 OBPs 能够与数量众多、结构迥异的植物源挥发物结合(Breer *et al.*, 1990)，这也为以该蛋白为基础，从植食性害虫的重要寄主植物挥发物中筛选引诱成分，设计高效的嗅觉引诱剂提供了重要的理论依据。

桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 又名东方果实蝇(oriental fruit fly)，属双翅目(Diptera)，实蝇科(Tephritidae)，果实蝇属 *Bactrocera* Macquart，是一类重要的检疫性害虫(谢琦和张润杰，2005; Wan *et al.*, 2011)。该虫寄主范围广，据报道可以为害 46 科 250 多种水果，对香蕉、番石榴、芒果和柑橘等为害严重(黄素青和韩日畴，2005；郑小萍等，2007)，给我国水果产业造成巨大的经济损失。目前生产上主要采取化学防治控制其危害，但化学农药不仅易污染水果和环境，且因其为害方式特殊(主要以成虫产卵于果实果皮下，幼虫潜居果瓤取食，有果皮的物理屏蔽)而难以奏效。由于植食性昆虫对其嗜好寄主植物的气味有明显的选择倾向(江丽容等，2010)，而桔小实蝇对于多种寄主水果也具有较明显的嗜好性。Siderhurst 和 Jang (2006)研究发现，热带水果榄仁 *Terminalia catappa* 果实的乙醇提取物对桔小实蝇雌成虫具有较强吸引作用。张淑颖等(2007)研究表明芒果果肉挥发物对桔小实蝇两性成虫均能产生显著的引诱效果。胡黎明等(2011)研究结果推测甜橙精油中的烯萜类、醇类和醛类化合物可能是甜橙精油引诱桔小实蝇的主要成分。因此我们可以根据桔小实蝇的主要寄主水果挥发物筛选和设计其嗅觉引诱剂，但由于挥发物成分种类复杂，如何筛选出合适的引诱剂配方成为制约桔小实蝇嗅觉引诱剂尤其是雌虫引诱剂的瓶颈。

如前所述，昆虫 OBPs 是设计嗅觉引诱剂的良好靶标，所以有必要对其嗅觉气味结合的生理功能进行研究。目前对 OBPs 的体外生理功能的研究主要采用荧光竞争结合实验，如二化螟 *Chilo suppressalis* 的 CsupGOBP2 (Gong *et al.*, 2009)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的 AaegOBP22 (Yang *et al.*, 2011)、草地螟 *Loxostege sticticalis* 的 LstiGOBP1(孙红岩等，2011)、麦长管蚜 *Sitobion avenae* 的 SaveOBP2 和 SaveOBP3 (Zhong *et al.*, 2012)以及甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 的 ABP2(张婷等，2012)等，为本实验研究桔小实蝇 OBP2 蛋白的体外生理功能提供了技术参考。而桔小实蝇嗅觉相关的分子生物学研究仅见其化学感受蛋白(Hu *et al.*, 2010)和气味受体(Zheng *et al.*, 2012)，未见有关 OBP 的报道。本研究克隆、表达并且纯化了桔小实蝇的气味结合蛋白 BdorOBP2，利用荧光竞争结合实验测定了 BdorOBP2 和 7 种专一性寄主植物挥发物主要成分的结合特征，为高效筛选基于寄主果实气味的引诱成分，设计更有效的桔小实蝇嗅觉引诱剂提供技术和方法。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

桔小实蝇为本实验室内人工饲养的种群。饲养条件为：温度 26±1℃，相对湿度 65%±5%，光周期 12L∶12D。待其化蛹、羽化后，收集性成熟时期的雌虫进行实验。

1.2　主要试剂

主要试剂及工具酶：总 RNA 提取试剂盒 Trizol、RT-PCR 系统、SYBR Premix Ex Taq 荧光试剂，限制性酶 *Eco*R Ⅰ 和 *Hin*d Ⅲ、T4 DNA 连接酶以及 pMD 18-T 载体等分子生物学试剂均购自 TaKaRa 公司；IPTG、X-Gal、氨苄青霉素等均购自生工生物工程(上海)股份有限公司；质粒微量抽提试剂盒、反应产物纯化试剂盒和凝胶回收试剂盒等购自 Axygen 公司；感受态细胞 Trans5α、BL21(DE3)购自北京全式金生物技术有限公司；原核表达载体 pET-32a 购自 Novagen 公司；亲和层析凝胶柱购自

北京韦氏博慧色谱科技有限公司；荧光探针 N-苯基-1-萘胺(N-phenyl-1-naphthylamine，1-NPN)和各种气味挥发性物质的标准样品均购自于百灵威公司，纯度都在97%以上；其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 总 RNA 提取及第一链的合成

取羽化后性成熟的桔小实蝇雌成虫 50 头，在冰上分别用镊子取下其触角、头、胸、腹、足及翅，操作时尽量保持各部分的完整性，然后按照总 RNA 抽提试剂盒使用说明提取桔小实蝇上述不同组织中的总 RNA，经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测后，按照反转录系统说明书进行反转录获得第一链 cDNA。

1.4 桔小实蝇 OBP 引物设计

根据 GenBank 中登录的桔小实蝇 *BdorOBP* 全长(GenBank 登录号：EU564816)，利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1)。为方便将目的片段亚克隆至其他载体上，在正反向引物 BdOBP-F、BdOBP-R 上分别设计了 *Eco*R Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ酶切位点(表 1 下划线)。另外设计荧光定量引物 qBdOBP-F 和 qBdOBP-R，以及内参基因引物 BdActin-F 和 BdActin-R(表 1)，引物由上海生工公司合成。

表 1 本研究所用桔小实蝇 OBP 基因引物列表

Table 1 Oligo nucleotide primers of the OBP genes for *Bactrocera dorsalis*

引物用途 Primer usage	引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequences
基因克隆	BdOBP-F	TAGAATTCATGCACTCCCGAAAGACTCTCCTGGG
Molecular cloning	BdOBP-R	CCGAAGCTTGTTARATCAARAAATAATGCTTTGG
	qBdOBP-F	CCCAAGGGCGATAATAAGTG
荧光定量 PCR	qBdOBP-R	GTGTCGGATTTCATACAAAGAG
Real-time PCR	BdActin-F	TGATGGTGGCTATGGTCAG
	BdActin-R	CACGATTGGCTTTGGGATTA

下划线示酶切位点 The restriction site is underlined.

1.5 桔小实蝇 *OBP* cDNA 的克隆和测序

以反转录酶合成的桔小实蝇 cDNA 第一链为模板，扩增桔小实蝇 *OBP2*，得到开放阅读框(ORF)全长。PCR 反应总体积为 20 μL，10×缓冲液 2 μL，1.9 μL Mg^{2+}(25 mmol/L)，正反引物各 0.5 μL (5 μmol/L)，dNTPs 混合液 1 μL(5 mmol/L)，模板 cDNA 1 μL，ddH_2O 12.9 μL，Taq 酶 0.2 μL。反应条件为：95℃预变性 4 min 后，95℃变性 45 s，57℃退火 45 s，72℃延伸 45 s，共进行 35 个循环，最后 72℃延伸 10 min。将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳并割胶纯化，克隆至 pMD18-T 载体内后，转化 Trans 5α 感受态细胞，最后将鉴定的阳性克隆菌送至上海桑尼生物科技有限公司进行测序。

1.6 序列分析

信号肽预测使用在线软件 SignalP (http://www.cbs.dtμ.dk/services/SignalP/)分析，序列相似性搜索使用 BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)工具；应用 ClustalX 1.83 软件进行序列比对，采用 MEGA 5 软件的邻位相连法(Neighbour-Joining)进行系统进化分析。

1.7 桔小实蝇 *OBP2* 的组织表达测定

利用 1.4 节中设计的引物，以 1.3 节中提取的各组织 cDNA 为模板，于 iCycler iQ5 real-time PCR 检测系统上进行操作，每一样品重复 3 次。荧光定量 PCR 检测的反应体系(25 μL)为：SYBR Premix Ex Taq™(2×) 12.5 μL，正反向引物(10 μmol/L)各 0.5 μL，cDNA 1 μL，ddH_2O 10.5 μL。荧光定量 PCR 扩增程序为 94℃ 1 min；94℃ 10 s，50℃ 30 s，72℃延伸 40 s，共 45 个循环，最后以每 10 s 上升 0.5℃的速度从 55℃到 95℃记录熔解曲线。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法(Livak and Schmittgen, 2001)对所得的 Ct 值进行计算，并使用 SPSS 软件进行方差分析。

1.8 重组表达载体的构建

用 *Eco*R Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ双酶切 1.5 节中的 PCR 产物，酶切产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳，利用胶回收试剂盒回收目的片段，然后将该片段与经过相同双酶切的 pET-32a 载体连接，按照常规方法将重组表达质粒 pET-*BdorOBP2* 转化宿主菌 BL21(DE3)。

1.9　诱导表达及纯化

挑取单菌落接种于含有氨苄青霉素（50 mg/mL）的液体 LB 培养基中，37℃振荡培养过夜。次日按 1∶100（v/v）的比例转接后，振荡培养至 OD_{600} 为 0.4～0.6 左右时，取 1 mL 菌液作为阴性对照，再向原菌液加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，于 30℃ 200 r/min 继续培养，每隔 1 h 取出 1 mL 菌液，以未诱导的菌液为阴性对照，用 SDS-PAGE 检测不同诱导时间桔小实蝇 OBP2 的表达效果。

将 400 mL 诱导好的大肠杆菌菌液 8 000 r/min 离心 10 min，弃上清，收集至 50 mL 离心管中，加入 5 mL 细菌裂解缓冲液（50 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，2 mmol/L EDTA，100 mmol/L NaCl，0.5% Triton X-100）和 100 μL 溶菌酶（100 mg/mL）充分重新悬浮菌体后，裂解过夜，次日超声破菌，高速离心后，分别取上清和沉淀用于表达形式的分析。在包涵体溶液中加入 5 mL 包涵体裂解液（50 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，1 mmol/L EDTA，100 mmol/L NaCl，8 mol/L 尿素），吹打溶解 1 h，10 000 r/min 离心后取上清。再用含有镍 NTA 琼脂糖亲和层析柱纯化目的蛋白，用不同浓度咪唑溶液洗脱后，收集的 7 管洗脱液各取 10 μL 进行 SDS-PAGE 分析，检测目的蛋白的纯度及所在收集管的位置。然后将确定含有纯桔小实蝇 OBP2 重组蛋白的洗脱液全部转移于透析袋中，在 500 mL 0.01 mol/L PBS 缓冲液（pH 7.4，含 7 mol/L 尿素），4℃逐次降低透析液浓度，进行透析复性 72 h，期间更换新鲜的 PBS 缓冲液 6 次。最后将透析好的蛋白用 Bradford 法定量至 1 mmol/L 后，转移至 1.5 mL Eppendorf 管内，保存于 －20℃冰箱备用。

1.10　桔小实蝇 OBP2 的配基结合试验

在室温条件下，使用 1 cm 的石英比色皿，在 RF-5301PC 型荧光分光光度计（日本岛津公司）上进行实验。首先测定桔小实蝇 OBP2 与 1-NPN 的结合曲线。将 1-NPN 荧光配基配成 10 mmol/L 母液并置于 4℃ 避光保存。移取 1 μmol/L 桔小实蝇 OBP2 溶液于石英比色皿中，逐次加入 3 μL 的 1 mmol/L 1-NPN 溶液反应 2 min 后，在 282 nm 波长下激发，记录荧光发射光谱及最大发射波长 328 nm 处时的荧光值，根据 Scatchard 方程（Scatchard, 1949）线性化光谱数据(1)（范成平等，2005）：

$$\frac{[D_t]-[D]}{[D]} = -K([D_t]-[D]) + nK[P_t] \quad (1)$$

其中 $[D_t]$ 和 $[D]$ 分别表示总的和体系中游离的 1-NPN 浓度，$[P_t]$ 为桔小实蝇 OBP2 重组蛋白的浓度，K 为 1-NPN 与桔小实蝇 OBP2 的结合常数，n 为结合位点数。

然后使用 1-NPN 作为荧光探针，利用竞争结合实验来研究候选配基与桔小实蝇 OBP2 重组蛋白的结合常数。将供试配基（溶于甲醇，浓度为 10 mmol/L）逐次加入到 1-NPN 与桔小实蝇 OBP2 混合液中，每次加入后反应时间 2 min，记录荧光值。根据公式(2)（Ban *et al.*, 2003b）计算候选配基结合常数 K_D：

$$K_D = \frac{[IC_{50}]}{\left(1 + \frac{[1-NPN]}{K_{1-NPN}}\right)} \quad (2)$$

其中 $[IC_{50}]$ 为竞争配基能替换 50% 的 1-NPN 时的浓度，[1-NPN] 为未结合 1-NPN 的浓度，$K_{1\text{-}NPN}$ 为 OBPs 与 1-NPN 的结合常数。

1.11　数据统计与分析

将荧光定量所得数据用 SPSS 16.0 进行方差分析，采用 Duncan 式多重比较检验法进行比较，分析桔小实蝇成虫不同组织中 OBP2 基因的表达量差异。

2　结果与分析

2.1　桔小实蝇 *OBP2* 的序列测定与分析

根据 GenBank 中桔小实蝇气味结合蛋白 OBP 基因（GenBank 登录号：EU564816）设计引物，克隆得到桔小实蝇 *OBP2* 开放阅读框全长，命名为 *BdorOBP2*（GenBank 登录号为 KC773766）。*BdorOBP2* 可读框及编码蛋白序列如图 1 所示。序列测定结果表明，*BdorOBP2* 可读框 ORF 全长 447 bp，编码 148 个氨基酸，预测分子量 17.44 kDa，等电点 5.72，信号肽预测结果显示 BdorOBP2 N-末端包含由起始位置开始的 23 个氨基酸组成的信号肽。该蛋白具有气味结合蛋白的一些典型特征，如序列中含有 6 个高度保守的半胱氨酸。

2.2　系统发育关系分析

通过对 *BdorOBP2* 序列的同源性搜索以及编码氨基酸的多序列比对（图 2），结果显示，*BdorOBP2* 氨基酸序列与其他双翅目昆虫的气味结合蛋白中都有 6 个保守的半胱氨酸残基，且序列一致性很高，其中一致性最高的为拟黄果蝇 *Drosophilia mojavensis* 和黑果蝇 *D. virilis*（分别为 88% 和 87%），其次是葱蝇 *Delia antiqua*（74%）。此外采用 MEGA 5 软件

中的 N-J 法构建了桔小实蝇与其他各目昆虫 OBPs 系统进化树(图 3)，从系统进化树上可以看出 BdorOBP2 与双翅目昆虫 OBPs 的进化关系较近，其中与葱地种蝇 DantOBP2 的进化关系最近。与鳞翅目(Lepidoptera)、膜翅目(Hymenoptera)、直翅目(Orthoptera)、鞘翅目(Coleoptera)、半翅目(Hemiptera)昆虫的进化关系较远。

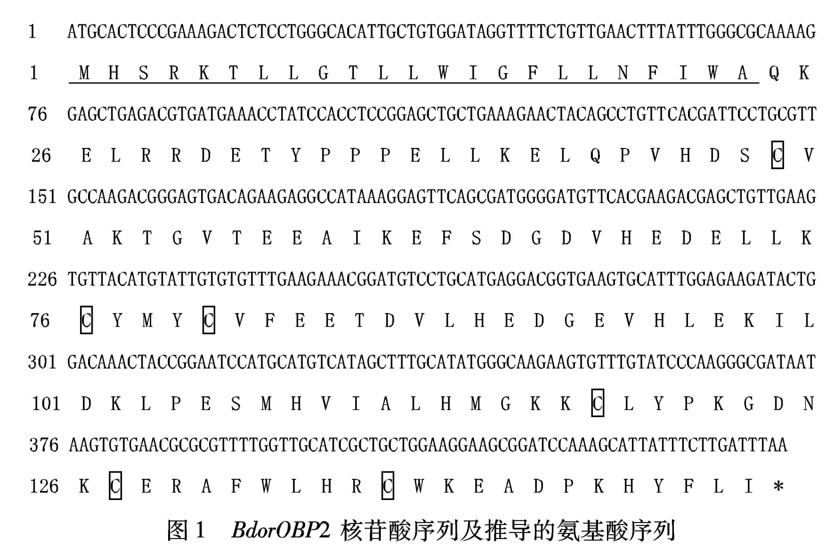


图 1 *BdorOBP2* 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and the deduced encoding amino acid sequence of *BdorOBP2*

下划线表示推导的信号肽；方框内表示 6 个保守的半胱氨酸。The predicted signal peptide sequence is underlined; six conserved cysteines are boxed.

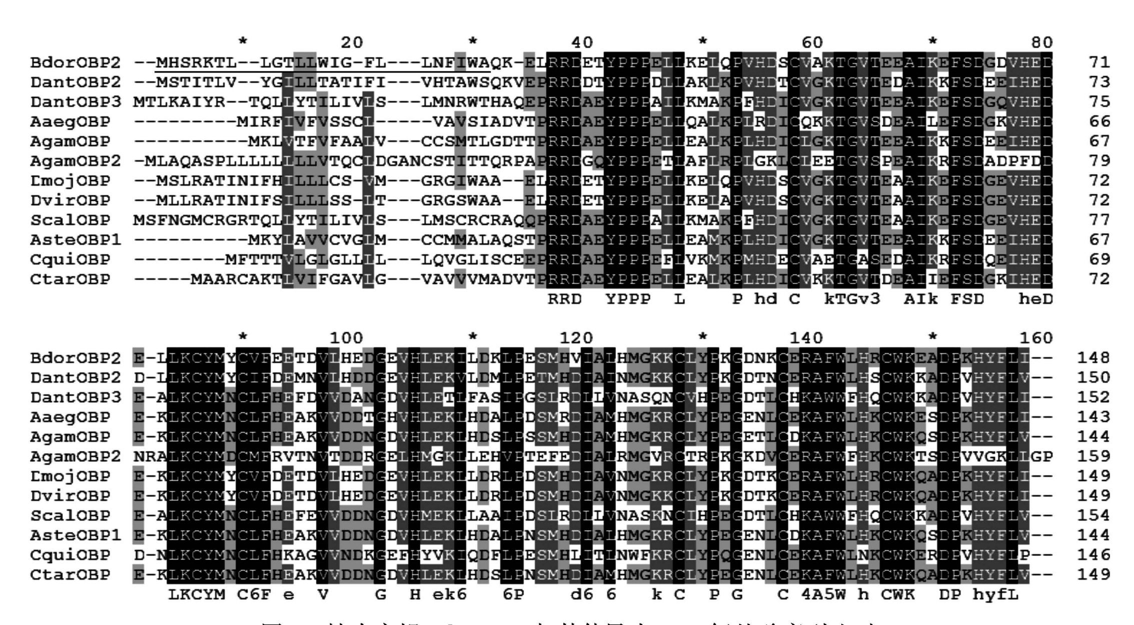


图 2 桔小实蝇 BdorOBP2 与其他昆虫 OBP 氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of BdorOBP2 from *Bactrocera dorsalis* with OBPs from other insects

OBP 来源及 GenBank 登录号 The origin of OBPs and their GenBank accession numbers: BdorOBP2: 桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* (KC773766); DantOBPs: 葱蝇 *Delia Antigua* (DantOBP2: BAI82442; DantOBP3: BAI82443); AaegOBP: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (XP_001663216); AgamOBPs: 冈比亚按蚊 *Annopheles gambiae* (AgamOBP: 2ERB; AgamOBP2: AAO12079); DmojOBP: 拟黄果蝇 *Drosophila mojavensis* (XP_001999215); DvirOBP: 黑果蝇 *Drosophila mojavensis* (XP_002058580); ScalOBP: 厩螯蝇 *Stomoxys calcitrans* (ACT75666); AsteOBP1: 斯氏按蚊 *Anopheles stephensi* (ACS83757); CquiOBP: 致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* (XP_001848939); CtarOBP: 环喙库蚊 *Culex tarsalis* (AAO73465). 下划线表示推导的信号肽。The predicted signal peptide sequence is underlined.

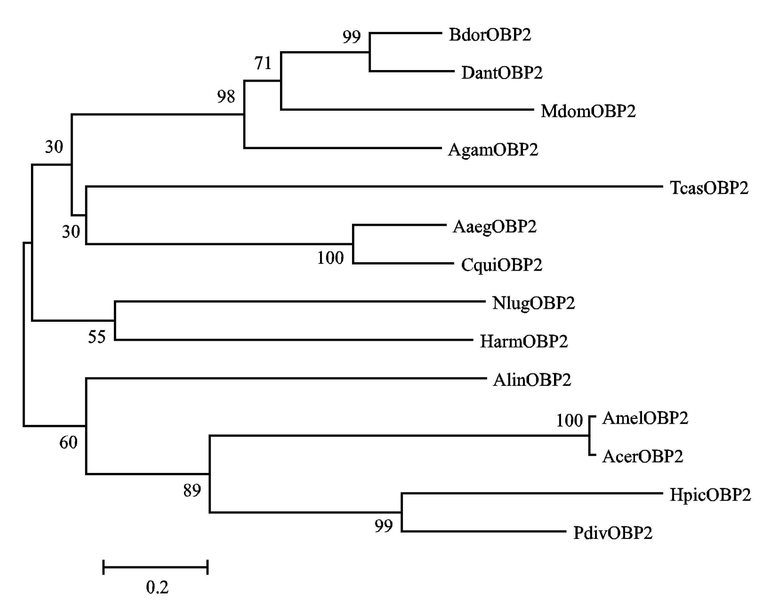


图 3　桔小实蝇 BdorOBP2 与其他昆虫 OBP2 的系统发育分析

Fig. 3　Phylogenetic analysis of BdorOBP2 and OBP2 from other insects

OBPs 的来源及 GenBank 登录号 The origin of OBPs and their GenBank accession numbers：BdorOBP2：桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis*（KC773766）；DantOBPs：葱蝇 *Delia antigua*（DantOBP2：BAI82442；DantOBP3：BAI82443）；AaegOBPs：埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（AaegOBP：XP_001663216；AaegOBP2：AAO74644）；AgamOBPs：冈比亚按蚊 *Annopheles gambiae*（AgamOBP：2ERB；AgamOBP2：AAO12079）；CquiOBPs：致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*（CquiOBP：XP_001848939；CquiOBP2：EDS5210）；DmojOBP：拟黄果蝇 *Drosophila mojavensis*（XP_001999215）；DvirOBP：黑果蝇 *Drosophila mojavensis*（XP_002058580）；ScalOBP：厩螫蚊 *Stomoxys calcitrans*（ACT75666）；MdomOBP2：家蝇 *Musca domestica*（AAU88251）；AsteOBP1：斯氏按蚊 *Anopheles stephensi*（ACS83757）；CtarOBP：环喙库蚊 *Culex tarsalis*（AAO73465）；AmelOBP2：西方蜜蜂 *Apis mellifera*（NP_001011591）；AcerOBP2：中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*（ABD97844）；TcasOBP2：赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*（EFA05676）；HpicOBP2：茶色长金龟 *Heptophylla picea*（BAC07271）；PdivOBP2：异发丽金龟 *Phyllopertha diversa*（BAA88062）；HarmOBP2：棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（AEB54586）；NlugOBP2：褐飞虱 *Nilaparvata lugens*（ACI30680）；AlinOBP2：苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus*（ACZ58028）. 标尺示遗传距离。The scale bar represents the genetic distance.

2.3　*BdorOBP2* 的组织表达谱

根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法，以头部中的表达量为基准，研究 *BdorOBP2* 在桔小实蝇不同组织的表达情况。结果表明，桔小实蝇 *BdorOBP2* 在头中相对表达量最高，在翅中相对表达量最低，是头部的 63%±6%。*BdorOBP2* 在胸、腹、足和触角中的相对表达量分别是头部的 93%±2%，81%±2%，99%±5% 和 86%±6%（图 4）。方差分析表明 *BdorOBP2* 在头、胸和足 3 组织中的相对表达量显著高于翅中的相对表达量。

2.4　BdorOBP2 蛋白的表达与纯化

在 IPTG 浓度为 1 mmol/L，温度为 30℃，诱导时间为 5 h，诱导转速为 200 r/min 的条件下表达 BdorOBP2，产物用 SDS-PAGE 电泳进行鉴定后，结果如图 5(A) 所示，泳道 1 为未经 IPTG 诱导的菌液，未检测到目的蛋白；泳道 2 为经 IPTG 诱导后的菌液，在 37 kDa 左右有特异性蛋白条带，和推测的分子量大小一致，并且蛋白是以包涵体形式表达（图 5B），表明成功表达出了 BdorOBP2。

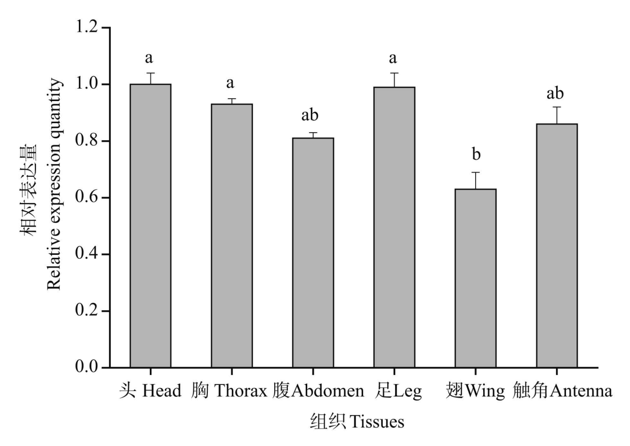


图 4　*BdorOBP2* 在桔小实蝇各组织中表达的定量 PCR 分析（$2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法）

Fig. 4　Real-time quantitative PCR analysis on the expression of *BdorOBP2* in various tissues of *Bactrocera dorsalis* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ method)

图中数据为平均值±标准误，柱上不同字母示不同组织间表达量存在显著差异（$P<0.05$）（采用 Duncan 式多重比较检验法）。Data in the figure are mean±*SE*, and different letters above bars indicate significant difference in the expression level among different tissues at the 0.05 level (Duncan's multiple range test)

由于功能实验需要有一定纯度的重组BdorOBP2，所以要对表达的蛋白进行变性、纯化和复性。本实验先对包涵体进行变性处理后，利用镍NTA琼脂糖凝胶柱先进行亲和层析纯化，再进行SDS-PAGE分析，结果如图5(C)所示。最后在4℃用7 mol/L尿素逐次降低透析液浓度，对目的蛋白进行透析复性后，然后用Bradford法定量至1 mmol/L，最后转移至1.5 mL Eppendorf管内，并保存于-20℃冰箱备用。

2.5 BdorOBP2与水果挥发物的荧光结合测定

在282 nm激发波长下，在1 μmol/L重组BdorOBP2溶液中，逐次加入3 μL 1 mmol/L的1-NPN溶液进行荧光扫描，如图6所示，荧光光谱的多项式拟合以及Scatchard方程(公式1)线性化拟合的相关系数分别达到0.9953和0.9927，BdorOBP2与1-NPN的结合常数为3.03 μmol/L，表明1-NPN非常适合作为BdorOBP2与植物配基结合的竞争性荧光探针。通过荧光竞争结合实验测定了7种桔小实蝇主要寄生水果挥发性物质和BdorOBP2的结合能力。由结合曲线(图7)和结合常数(表2)可以看出，该蛋白对于酯类和醛类有很强的结合能力，其中对反-2-己烯醛和β-紫罗兰酮的结合能力最强，结合常数分别为9.96和15.37 μmol/L。此外这7种挥发性物质均能将1-NPN从

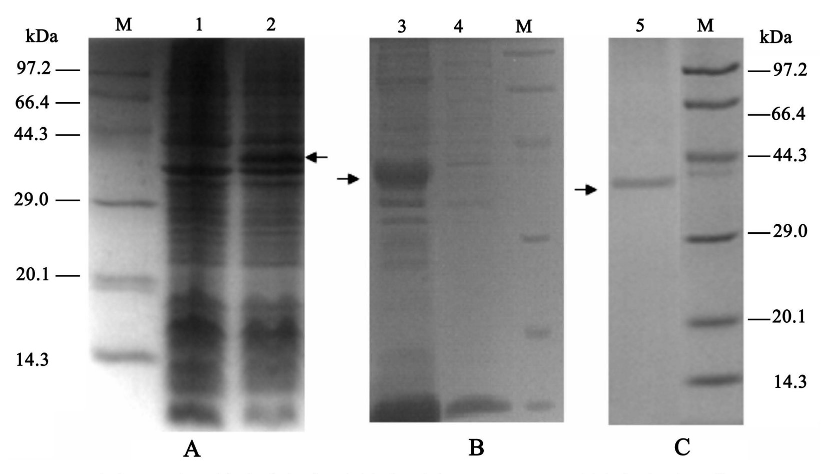


图5 重组桔小实蝇气味结合蛋白BdorOBP2诱导表达及纯化

Fig. 5 Expression and purification of the recombinant protein pET32a-BdorOBP2

M：蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker；1：未诱导的pET32a-BdorOBP2的BL21(DE3)菌体 Non-induced BL21(DE3) of pET32a-BdorOBP2；2：经IPTG诱导的pET32a-BdorOBP2菌体 pET32a-BdorOBP2 after induction with IPTG；3：pET32a-BdorOBP2经超声破碎后的沉淀 Pellet of pET32a-BdorOBP2 after sonication；4：pET32a-BdorOBP2经超声破碎后的上清 Supernatant of pET32a-BdorOBP2 after sonication；5：纯化后的pET32a-BdorOBP2 (Purified protein pET32a-BdorOBP2 protein).

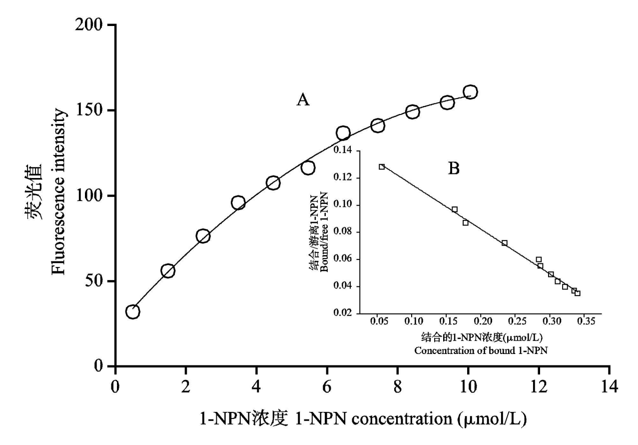


图6 荧光配基1-NPN与重组BdorOBP2蛋白的结合曲线

Fig. 6 Binding curve of fluorescent ligand 1-NPN with recombinant protein BdorOBP2

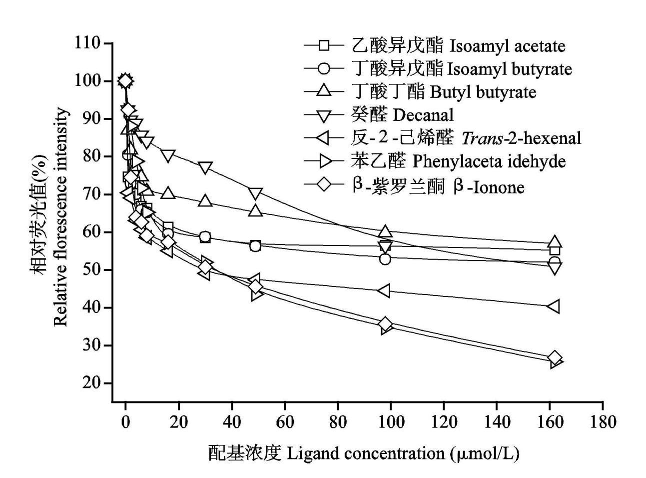


图7 候选配基和荧光配基1-NPN与重组BdorOBP2的竞争结合

Fig. 7 Competitive binding of candidate ligands and 1-NPN with recombinant protein BdorOBP2

表 2　桔小实蝇 BdorOBP2 与水果气味挥发物质的结合特性

Table 2　Binding characteristics of BdorOBP2 from *Bactrocera dorsalis* with fruit odor volatiles

水果挥发物 Fruit odor volatiles		最大竞争能力(%) Maximum capability to compete with 1-NPN	[IC_{50}] (μmol/L)	结合常数 (μmol/L) Dissociation constant K_D	寄主植物 Host plant	寄主果实中的相对含量(%) Relative content in fruits of host plant
醛类 Aldehydes	反-2-己烯醛 *Trans*-2-hexenal	30	26.47	9.96	番石榴 Guava	1.03
	苯乙醛 Phenylaceta idehyde	26	41.72	15.69	葡萄 Grape	2.75
	癸醛 Decanal	43	185.49	69.78	甜橙 *Citrus sinensis*	3.09
酯类 Esters	丁酸异戊酯 Isoamyl butyrate	48	195.90	73.70		19.31
	丁酸丁酯 Butyl butyrate	47	242.55	91.25	香蕉 Banana	5.89
	乙酸异戊酯 Isoamyl acetate	45	283.59	106.69		13.0
酮类 Ketones	β-紫罗兰酮 β-Ionone	7	40.85	15.37	葡萄 Grape	2.25

BdorOBP2 的相对荧光值竞争至 50% 以下，尤其 β-紫罗兰酮能将相对荧光值竞争至 10% 以下。

3　讨论

昆虫气味结合蛋白识别和结合外界气味分子是昆虫感受外界气味分子的第一步生化反应，对昆虫与外界进行信息交流具有重要意义(Vogt *et al.*, 1999)。本试验通过对桔小实蝇气味结合蛋白 BdorOBP2 序列分析表明，BdorOBP2 呈弱酸性，预测分子量约为 17.44 kDa，序列中有 6 个保守的半胱氨酸位点，具有气味结合蛋白的典型特征，并且 N-末端包含一个 23 个氨基酸残基组成的信号肽，与报道的昆虫气味结合蛋白特征基本一致(Leal, 2005; Pelosi *et al.*, 2005)。

气味结合蛋白 OBPs 是昆虫专一性识别外界气味物质的特异性蛋白，而触角作为昆虫最主要的嗅觉感受器官(王桂荣等, 2002; Zubkov *et al.*, 2005)，理论上 OBPs 应该主要分布在触角等嗅觉器官上。而本实验的结果显示气味结合蛋白在桔小实蝇雌虫各组织中均有表达，且表达丰度差异不甚明显。这与黄蜂 *Polistes ominµlµs* (Calvello *et al.*, 2005)、瓜实蝇 *Bactrocera cucurbitae* (申建梅等, 2011)和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (李正西和 Zhou, 2004)等某些 OBP 基因的表达非常类似，暗示了昆虫的某些气味结合蛋白不仅起到嗅觉作用，还可能参与了其他生理功能。Zhang 等(2011, 2012)的研究表明实蝇类昆虫的下颚须和前、中、后足跗节上锥形感受器可能具有嗅觉感受的功能。而本实验中 *BdorOBP2* 在桔小实蝇头和足中呈较高丰度表达，这也暗示了该基因在其他非嗅觉组织中也具有生理作用。

为了深入探讨 BdorOBP2 的功能，本研究利用原核表达系统表达和纯化了重组 BdorOBP2，由于在大多数情况下，较小的多肽标签对融合蛋白质结构影响很小，尽管有可能会影响蛋白质的活性(Wu and Filutowica, 1999)，但也取决于标签的位置和氨基酸的组成(Bucher *et al.*, 2002)，而信号肽的存在与否对 BdorOBP2 蛋白的三维结构变化不大，N 端没有折叠到蛋白内部，推测信号肽的存在并不影响其结合结构的活性。最后的荧光结合实验也表明，重组 BdorOBP2 可以与其主要寄主水果挥发物产生较强的结合能力。如乙酸异戊酯、丁酸异戊酯和丁酸丁酯等酯类物质都是桔小实蝇主要寄主水果之一——香蕉在成熟时所释放出来的，其含量明显高于未成熟香蕉，而桔小实蝇在取食寄主时则更趋向于选择能够释放这些酯类挥发物的成熟香蕉(Armstrong, 2001)，同时未成熟香蕉中由于酯类成分非常少，桔小实蝇的嗜好性也下降(朱虹等, 2007; 陶晨等, 2010)。而醛类物质结合力强，推测可能是由于醛基(-C═OH)在触角感受器淋巴液中的溶解度很高，便于被昆虫识别(孙红岩等, 2011)。上述研究表明这些水果重要的挥发气味在桔小实蝇对寄主水果进行定位、产卵和危害等过程中具有重要作用。下一步我们计划将那些能与桔小实蝇 BdorOBP2 具有较好结合能力的气味按照一定比例混合，从而筛选配制复合型诱剂，并通过触角电位和“Y”型嗅觉行为反应等进行进一步验证。

参考文献(References)

Armstrong JW, 2001. Quarantine security of bananas at harvest maturity

against Mediterranean and oriental fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. *Journal of Economic Entomology*, 94(1): 302 -314.

Ban L, Scaloni A, Ambrosio CD, Zhang L, Yan Y, Pelosic P, 2003a. Biochemical characterization and bacterial expression of an odorant-binding protein from *Locusta migratoria*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(2): 390 -400.

Ban L, Scalonib A, Brandazza A, Angeli S, Zhang L, Yan Y, Pelosi P, 2003b. Chemosensory proteins of *Locusta migratoria*. *Insect Molecular Biology*, 12(2): 125 -134.

Breer H, Krieger J, Raming K, 1990. A novel class of binding proteins in the antennae of the silk moth *Antheraea pernyi*. *Insect Biochemistry*, 20(7): 735 -740.

Bucher MH, Evdokimov AG, Waugh DS, 2002. Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. *Acta Crystallographica Section D*, 58 (Pt 3): 392 -397.

Calvello M, Brandazza A, Navarrini A, Dani FR, Turillazzi S, Felicioli A, Pelosi P, 2005. Expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in some Hymenoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4): 297 -307.

Fan CP, Shang ZC, Guo M, Yu QS, 2005. Study on the interaction between gatifloxacin and bovine lactoferrin by fluorescence spectrophotometry. *Journal of Zhejiang University (Science Edition)*, 32(1): 62 -65. [范成平, 商志才, 郭明, 俞庆森, 2005. 荧光法研究加替沙星与牛乳铁蛋白的相互结合作用. 浙江大学学报(理学版), 32(1): 62 -65]

Gong ZJ, Zhou WW, Yu HZ, Mao CG, Zhang CX, Cheng JA, Zhu ZR, 2009. Cloning, expression and functional analysis of a general odorant-binding protein 2 gene of the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). *Insect Molecular Biology*, 18(3): 405 -417.

Gotzek D, Robertson HM, Wurm Y, Shoemaker D, 2011. Odorant binding proteins of the red imported fire ant, *Selenopsis invicta*: an example of the problems facing the analysis of widely divergent proteins. *PLoS ONE*, 6(1): 1 -9.

Hu LM, Shen JM, Hu MY, 2010. Screening of T7 phage displayed *Bactrocera dorsalis* (Hendel) antenna cDNA library against chemosensory protein. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 75(3): 174 -186.

Hu LM, Shen JM, Zeng L, Bin SY, Lu YY, Lin JT, 2011. Behavior response of *Bactrocera dorsalis* to essential oil from *Citrus sinensis* and an analysis of chemical components of the volatile. *Guangdong Agricultural Sciences*, 16: 71 -73. [胡黎明, 申建梅, 曾玲, 宾淑英, 陆永跃, 林进添, 2011. 桔小实蝇对甜橙精油的行为反应及精油化学成分分析. 广东农业科学, 16: 71 -73]

Huang SQ, Han RC, 2005. Advance in the research on the quarantine pest *Bactrocera dorsalis*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(5): 479 -484. [黄素青, 韩日畴, 2005. 桔小实蝇的研究进展. 昆虫知识, 42(5): 479 -484]

Jiang LR, Liu SA, Han BY, OuYang LM, 2010. Effect of odours from seven spcies of host and non-host plants on the adult behaviour of the tea geometrid, *Ectropis obliqua* (Prout). *Acta Ecologica Sinica*, 30 (18): 4993 -5000. [江丽容, 刘守安, 韩宝瑜, 欧阳立明, 2010. 7 种寄主和非寄主植物气味对茶尺蠖成虫行为的调控效应. 生态学报, 30(18): 4993 -5000]

Kim MS, Smith DP, 2001. The invertebrate odorant-binding protein LUSH is required for normal olfactory behavior in *Drosophila*. *Chemical Senses*, 26(2): 195 -199.

Leal WS, 2005. Pheromone reception. *Topics in Current Chemistry*, 240: 1 -36.

Li HL, Nie WM, Gao QK, Cheng JA, 2008. Cloning of cDNA encoding odorant binding protein ASP2 in working bee's antenna of *Apis cerana cerana* and its prokaryotic expression. *Scientia Agricultura Sinica*, 41(3): 933 -938. [李红亮, 聂文敏, 高其康, 程家安, 2008. 中华蜜蜂气味结合蛋白 ASP2 cDNA 的克隆及原核表达. 中国农业科学, 41(3): 933 -938]

Li HL, Zhang LY, Zhuang SL, Ni CX, Han BY, Shang HW, 2013. Interpretation of odorant binding function and mode of general odorant binding protein ASP2 in Chinese honeybee (*Apis cerana cerana*). *Scientia Agricultura Sinica*, 46(1): 154 -161. [李红亮, 张林雅, 庄树林, 倪翠侠, 韩宝瑜, 商晗武, 2013. 中华蜜蜂普通气味结合蛋白 ASP2 的气味结合功能模式分析. 中国农业科学, 46(1): 154 -161]

Li ZX, Zhou JJ, 2004. Cloning, identification and expression profiling of the cDNAs of odorant-binding proteins in the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Acta Entomologica Sinica*, 47(4): 417 -423. [李正西, Zhou JJ, 2004. 冈比亚按蚊嗅觉结合蛋白候选基因 cDNA 的克隆、鉴定及其表达型分析. 昆虫学报, 47(4): 417 -423]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 25(4): 402 -408.

Pelosi P, Calvello M, Ban L, 2005. Diversity of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in insects. *Chemical Senses*, 30(Suppl. 1): i291 -i292.

Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvello M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63 (14): 1658 -1676.

Scatchard G, 1949. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 51(4): 660 -672.

Shen JM, Hu LM, Bin SY, Liao HZ, Lin JT, 2011. Cloning and prokaryotic expression of cDNA encoding general odorant binding protein from *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett). *Journal of Huazhong Agricultural University*, 30(4): 455 -460. [申建梅, 胡黎明, 宾淑英, 廖泓之, 林进添, 2011. 瓜实蝇普通气味结合蛋白基因的克隆及原核表达. 华中农业大学学报, 30(4): 455 -460]

Siderhurst MS, Jang EB, 2006. Attraction of female oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, to *Terminalia catappa* fruit extracts in wind tunnel and olfactometer tests. *Formosan Entomologist*, 26: 45 -55.

Sun HY, Yi J, Feng HL, Li KB, Xi JH, Cao YZ, 2011. Expression, purification and binding characteristics of general odorant binding protein Ⅰ (GOBP1) from the meadow moth, *Loxostege sticticalia*

(Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralididae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(4): 381 –389. [孙红岩, 尹姣, 冯红林, 李克斌, 席景会, 曹雅忠, 2011. 草地螟普通气味结合蛋白 I (LstiGOBP1) 蛋白表达纯化及结合特性分析. 昆虫学报, 54(4): 381 –389]

Tao C, Wang DP, Yang XS, Yu YS, 2010. Determination of aroma components of banana by SPME coupled with GC-MS. *Journal of Gansu Agricultural University*, 45(4): 139 –141. [陶晨, 王道平, 杨小生, 余跃生, 2010. 固相微萃取气相色谱质谱法分析香蕉中的香气成分. 甘肃农业大学学报, 45(4): 139 –141]

Vogt RG, Callahan FE, Rogers ME, Dickens JC, 1999. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders, as indicated by LAP, an OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris* (Hemiptera, Heteroptera). *Chemical Senses*, 24(5): 481 –495.

Vogt RG, Prestwich GD, Lerner MR, 1991. Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects. *Journal of Neurobiology*, 22(1): 74 –84.

Wan X, Nardi F, Zhang B, Liu Y, 2011. The oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, in China: origin and gradual inland range expansion associated with population growth. *PLoS ONE*, 6(10): 1 –10.

Wang GR, Guo YM, Wu KM, 2002. Progress in the studies of antenna odorant binding proteins of insects. *Acta Entomologica Sinica*, 45(1): 131 –137. [王桂荣, 郭予元, 吴孔明, 2002. 昆虫触角气味结合蛋白的研究进展. 昆虫学报, 45(1): 131 –137]

Wu J, Filutowica M, 1999. Hexahistidine (His_6)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale. *Acta Biochimica Polonica*, 46(3): 591 –599.

Xie Q, Zhang RJ, 2005. Study advance on biology and ecology of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) and its control. *Ecologic Science*, 24(1): 52 –56. [谢琦, 张润杰, 2005. 桔小实蝇生物学特点及其防治研究概述. 生态科学, 24(1): 52 –56]

Yang G, Winberg G, Ren H, Zhang S, 2011. Expression, purification and functional analysis of an odorant binding protein AaegOBP22 from *Aedes aegypti*. *Protein Expression and Purification*, 75(2): 165 –171.

Yasukawa J, Tomioka S, Aigaki T, Matsuo T, 2010. Evolution of expression patterns of two odorant-binding protein genes, *Obp57d* and *Obp57e*, in *Drosophila*. *Gene*, 467(1 –2): 25 –34.

Zhang GN, Hu F, Dou W, Wang JJ, 2012. Morphology and distribution of sensilla on tarsi and ovipositors of six fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 105(2): 319 –327.

Zhang GN, Hull-Sanders H, Hu F, Dou W, Niu JZ, Wang JJ, 2011. Morphological characterization and distribution of sensilla on maxillary palpi of six *Bactrocera* fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 94(3): 379 –388.

Zhang SY, Xiao C, Li ZY, Jiang XL, Tai HK, Hu CH, Wang X, 2007. Attraction of the volatiles from mango fruits for oriental fruit fly, *Dacus dorsalis* (Hendel). *Journal of Yunnan Agricultural University*, 22(5): 659 –664. [张淑颖, 肖春, 李正跃, 蒋小龙, 太红坤, 胡纯华, 王旭, 2007. 芒果挥发物对桔小实蝇成虫的引诱作用. 云南农业大学学报, 22(5): 659 –664]

Zhang T, Liu NY, Dong SL, 2012. cDNA cloning, tissue distribution and ligand binding characteristics of antennal binding protein 2 from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(5): 499 –509. [张婷, 刘乃勇, 董双林, 2012. 甜菜夜蛾触角结合蛋白 Ⅱ 的 cDNA 克隆、组织分布及配体结合特性分析. 昆虫学报, 55(5): 499 –509]

Zhang TT, Gu SH, Wu KM, Zhang YJ, Guo YY, 2011. Construction and analysis of cDNA libraries from the antennae of male and female cotton bollworms *Helicoverpa armigera* (Hübner) and expression analysis of putative odorant-binding protein genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407(2): 393 –399.

Zheng WW, Zhu CP, Peng T, Zhang HY, 2012. Odorant receptor co-receptor orcois upregulated by methyl eugenol in male *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Physiology*, 58: 1122 –1127.

Zheng XP, Liu QS, Xie Q, Zhang RJ, 2007. Influence of larvae feeding experience on the oviposition preference of *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Acta Scientiarum Naturalium Universitais Sunyatseni*, 46(6): 84 –87. [郑小萍, 刘群山, 谢琦, 张润杰, 2007. 桔小实蝇幼虫取食经历对成虫产卵选择性的影响. 中山大学学报(自然科学版), 46(6): 84 –87]

Zhong T, Yin J, Deng S, Li K, Cao Y, 2012. Fluorescence competition assay for the assessment of green leaf volatiles and *trans*-beta-farnesene bound to three odorant-binding proteins in the wheat aphid *Sitobion avenae* (Fabricius). *Journal of Insect Physiology*, 58(6): 771 –781.

Zhou JJ, Robertson G, He X, Dufour S, Hooper AM, Pickett JA, Keep NH, Field LM, 2009. Characterisation of *Bombyx mori* odorant-binding proteins reveals that a general odorant-binding protein discriminates between sex pheromone components. *Journal of Molecular Biology*, 389(3): 529 –545.

Zhu H, Chen YF, Li XP, Li J, Han DF, Chen WX, 2007. Determination of volatiles in harvested banana fruit by HS-SPME and GC-MS. *Acta Horticulturae Sinica*, 34(2): 485 –488. [朱虹, 陈玉芬, 李雪萍, 李军, 韩冬芳, 陈维信, 2007. 顶空固相微萃取气-质联用分析香蕉的香气成分. 园艺学报, 34(2): 485 –488]

Zubkov S, Gronenborn AM, Byeon IJ, Mohanty S, 2005. Structural consequences of the pH-induced conformational switch in *A. polyphemus* pheromone-binding protein: mechanisms of ligand release. *Journal of Molecular Biology*, 354(5): 1081 –1090.

(责任编辑：赵利辉)